

01997.020000.4

PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:	)	
	:	Examiner: Karen A. Canella, Ph.D.
SEISHI KATO, ET AL.	)	
	:	Group Art Unit: 1642
Application No.: 09/485,951	)	
	:	
Filed: February 17, 2000	)	
	:	
For: HUMAN GELECTIN-9-LIKE	)	
PROTEINS AND cDNAs	:	
ENCODING THESE PROTEINS	)	November 18, 2002

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

RECEIVED  
TECH CENTER 1600/2900  
02 NOV 19 PM 12:01

SUBMISSION OF CERTIFIED  
PRIORITY DOCUMENT AND VERIFIED TRANSLATION

Sir:

Further to our amendment dated September 4, 2002, enclosed is a Certified  
Copy of Applicants priority document JP 1997-226468 filed August 22, 1997. Also  
enclosed is a verified translation of the same.

Entry hereof is respectfully requested.

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our below listed address.

Respectfully submitted,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Lawrence S. Perry", written over a horizontal line.

Attorney for Applicants

Lawrence S. Perry

Registration No. 31,865

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO  
30 Rockefeller Plaza  
New York, New York 10112-3801  
Facsimile: (212) 218-2200

NY\_MAIN 299388v1

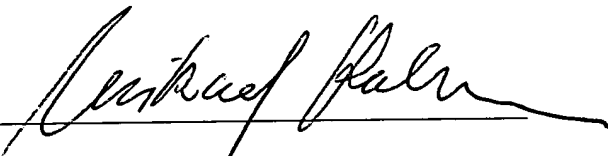


## AFFIDAVIT OF ACCURACY

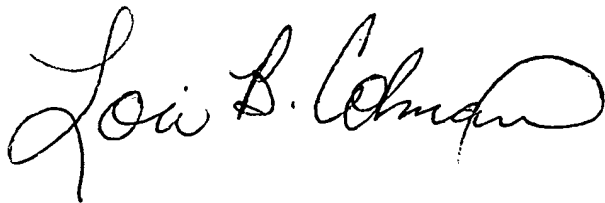
STATE OF NEW YORK     )  
  ) ss.:  
COUNTY OF NEW YORK )

This is to certify that the attached translation, No. J1002-10843, is an accurate, true and complete translation from Japanese into English of **Patent Application No. 9-226468 ("Human Galectin-9-Like Protein and cDNA For Encoding the Same")**, to the best of my knowledge and belief.

RENNERT BILINGUAL TRANSLATION GROUP

By:   
Mikael E. Poulsen  
Director

SWORN TO AND SUBSCRIBED  
BEFORE ME THIS  
October 30, 2002



LORI B. COLMAN  
Notary Public - State of New York  
No. 01006070792  
Qualified in Westchester County  
My Commission Expires March 11, 2006

216 EAST 45TH STREET, NEW YORK, NY 10017 USA

TELEPHONE (212)867-8700 ■ FAX (212)867-7666 ■ [www.rennert.com](http://www.rennert.com) ■ [translations@rennert.com](mailto:translations@rennert.com)

Japan Patent Office

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application:	August 22, 1997
Application Number:	9-226468
[ST.10/C]:	[JP1997-226468]
Applicant(s):	Sagami Chemical Research Institute Protegene Co., Ltd.

September 24, 2002

Commissioner, Japan Patent Office

Shinichiro OTA

Confirmation Number 2002-3073805

Application No. 9-226468

[Document Name]	Patent Application
[File Number]	SO18114
[Date Filed]	August 22, 1997
[Addressee]	Commissioner of the Japan Patent Office
[Title of the Invention]	Human Galectin-9-Like Protein and cDNA For Encoding the Same
[Number Of Claims]	5
[Inventor]	
[Name]	Seiji KATO
[Address]	3-46-50, Wakamatsu, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken
[Inventor]	
[Name]	Kazuko YAMAGUCHI
[Address]	5-13-11, Takasago, Katsushika-ku, Tokyo
[Inventor]	
[Name]	Shingo SEKINE
[Address]	4-4-1, Nishionuma, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken
[Inventor]	
[Name]	Tsuguhisa KAMATA
[Address]	5-17-8, Kamitsuru, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken
[Applicant]	
[Representative Applicant]	
[Identification Number]	000173762
[Name]	Sagami Chemical Research Institute
[Address]	4-4-1, Nishionuma, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken
[Postal Code]	226
[Representative]	Akira KONDO
[Telephone Number]	0427 (42) 4791
[Applicant]	
[Identification Number]	596134998
[Name]	Protegene Co., Ltd.
[Address]	2-20-3, Nakamachi, Meguro-ku, Tokyo
[Postal Code]	153
[Representative]	Takeo TANAI
[Indication of Charges]	
[Payment Method]	
[Prepayment Account No]	011501
[Amount Paid]	¥ 21,000
[Record of Items Submitted]	
[Item] Specification	1
[Item] Drawings	1
[Item] Abstract	1
[Proof]	Required

[Document Name] Specification

[Title of Invention] Human Galectin-9-Like Protein and cDNA For Encoding the Same

[Claims]

[Claim 1] A protein including the amino acid sequence expressed by Sequence No. 1.

[Claim 2] The protein described in Claim 1, wherein the protein includes the amino acid sequence expressed by Sequence No. 2.

[Claim 3] cDNA including the base sequence expressed by Sequence No. 3.

[Claim 4] The cDNA described in Claim 3, wherein the cDNA includes the base sequence expressed by Sequence No. 4.

[Claim 5] The cDNA described in Claim 3 and Claim 4, wherein the cDNA includes the base sequence expressed by Sequence No. 5.

[Detailed Explanation of the Invention]

[0001]

[Industrial Field of Application]

The present invention relates to a human galectin-9-like protein and cDNA for encoding the same. The protein of the present invention can be used as a medicine or as a reagent for sugar chain research. The human cDNA of the present invention can be used as a genetic diagnostics probe or the gene source for gene therapy. The cDNA can be used as the gene source for mass production of encoded proteins.

[0002]

[Prior Art]

Galectins are animal lectins bonded to galactose. Animal lectins are located in various places such as cytoplasm, nuclei and cytomembranes. They are believed to contribute to cell proliferation, differentiation, canceration, transference and immunization [Drickamer, K., Annu. Rev. Cell Biol. 9: 237-264 (1993)]. Nine galectins (galectin-1 through galectin-9) are currently known.

[0003]

Galectin-9 is a lectin that was identified as the antigen protein that reacts with the antibodies contained in the serum of patients with Hodgkin's Lymphoma [Tureci, O., J. Biol. Chem. 272: 6418-6422 (1997)]. Galectin-9, like galectin-4 and galectin-8, have a structure in which two sugar chain bond domains are linked by a linker peptide. Its role in the body is not yet completely understood, but it is believed to contribute to adhesion between cells. Two types of galectin-9 with different molecular weights have been reported in mice [Wada, J. and Kanwar, Y.S., J. Biol. Chem. 272: 6078-6086 (1997)], but different isoforms in human beings have not been reported.

[0004]

[Problem Solved by the Invention]

The purpose of the present invention is to provide a human galectin-9-like protein and cDNA for encoding the same.

[0005]

[Means of Solving the Problem]

As a result of extensive research, the present inventors were able to clone human cDNA for encoding galectin-9-like proteins. The present invention is the product of this discovery. In other words, the present invention provides a galectin-9-like protein, and proteins containing the amino acid sequences expressed by Sequence No. 1 and Sequence No. 2. The present invention also provides cDNA containing the base sequences expressed in Sequence No. 3 through Sequence No. 5 for encoding these proteins.

[0006]

[Embodiment of the Invention]

The proteins in the present invention can be obtained by isolating them from human organs and cell lines, preparing peptides through chemical synthesis based on the amino acid sequences in the present invention, or producing them through recombinant DNA technology using DNA for encoding the human galectin-9-like proteins of the present invention. Ideally, they should be obtained using recombinant DNA technology. For example, RNA can be prepared through an in vitro transfer from a vector with the cDNA of the present invention, followed by in vitro expression through in vitro translation using the RNA as the template. If the translated section is recombined in an appropriately expressed vector using a method well known in the art, proteins encoded with E.coli, Bacillus subtilis, yeast and animal cells can be expressed in large amounts.

[0007]

[Means of Solving the Problem]

When a protein of the present invention is expressed by a microorganism such as E.coli, an expression vector is prepared in which the translated section of the cDNA of the present invention is recombined with an expression vector having an origin, promoter, ribosome bonding site, cDNA cloning site and terminator replicatable in the microorganism. If, after transforming host cells using this expression vector, the transformants are cultivated, the proteins with the encoded cDNA can be mass produced in the microorganism. This can also be expressed as a fused protein with another protein. The protein portion with the encoded cDNA can be obtained by breaking the fused protein using the appropriate protease. If there is lactose bonding activity, the fused protein is considered a protein of the present invention.

[0008]

If a protein of the present invention can be secreted and expressed by an animal cell, the translated section of the cDNA is recombined with an animal cell expression vector with a promoter, splicing section and a poly (A) addition site. If this is introduced to animal cells, the protein of the present invention can be secreted and expressed outside of the cells.

[0009]

[Preferred Embodiment of the Invention]

The proteins of the present invention include peptide fragments (with 5 or more amino acid residues) including a partial amino acid sequence from the amino acid sequence expressed by Sequence No. 1. These peptide fragments can be used as antigens to manufacture antibodies. The proteins of the present invention can be excreted outside of cells. Because there are sites in the amino acid sequence where sugar chains can be bonded, a protein with an added sugar chain can be obtained if expressed in the appropriate animal cell. Therefore, these peptides and proteins with added sugar chains are considered proteins of the present invention.

[0010]

The DNA of the present invention includes all DNA that encodes these proteins. The DNA can be obtained using the chemical synthesis method and the cDNA cloning method.

[0011]

The human cDNA of the present invention can be cloned from a cDNA library derived from human cells. Here, poly (A) +RNA extracted from the human cells in the cDNA library is manufactured as the template. The human cells are any cells that can be removed from human beings during surgery and cultivated. In this embodiment, poly (A) +RNA isolated from stomach cancer tissue is used. The cDNA synthesis can be performed using the Okayama-Berg Method [Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol. 2:161-170 (1982)] or the Gubler-Hoffman Method [Gubler, U. and Hoffman, J. Gene 25: 263-269 (1983)]. In order to effectively perform full-length cloning, the Capping Method [Kato, S. et al., Gene 150: 243-250 (1994)] should be performed. The cDNA can be identified by determining all of the base sequences using sequencing, searching the existing proteins for amino acid sequences or analogous sequences anticipated by the base sequences, expressing proteins using in vitro translation, expressing proteins using E.coli, and measuring the activity of the expressed products. The activity measurement is performed by confirming bondability with lactose.

[0012]

The cDNA of the present invention is characterized by the inclusion of base sequences expressed by Sequence No. 3 and Sequence No. 4. The expression of Sequence No. 5 had a base sequence at 1725 bp and an open reading frame at 1068 bp. This open reading frame encodes proteins with 355 amino acid residues. This protein bears a high (69.3%) resemblance to mouse galectin-9 isoforms at the amino acid sequence level.

[0013]

Clones identical to the cDNA of the present invention can be obtained by screening a human cDNA library prepared from human cells using an oligonucleotide probe synthesized based on the cDNA base sequence described in Sequence No. 3.

[0014]

Polymorphisms are frequently found in human genes due to individual differences. Therefore, cDNA consisting of one or more nucleotides added, deleted and/or substituted by other nucleotides in Sequence No. 3 through Sequence No. 5 are included in the present invention.

[0015]

Similarly, proteins with one or more amino acids added, deleted and/or substituted by other amino acids are also included in the present invention to the extent that they have human galectin-9 activity.

[0016]

The cDNA of the present invention also includes cDNA fragments (10 bp or more) with a partial base sequence from the base sequence expressed by Sequence No. 3. This includes DNA fragments with sense strands and antisense strands. These DNA fragments can be used as probes for genetic diagnostics.

[0017]

#### [Working Examples]

The following is a detailed explanation of the present invention with reference to working examples. The present invention is by no means restricted to these working examples. Basic manipulation and enzymatic reactions for recombinant DNA is described elsewhere ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989]. Where unspecified, the restriction enzymes and modification enzymes manufactured by Takara Shuzo Co., Ltd. were used. The buffer solution compositions and reaction conditions for the various enzymatic reactions are described in the accompanying instructions.

[0018]

#### (1) cDNA Cloning

As a result of large-scale base sequence determination selected from the human stomach cancer cell cDNA library (WO 97/03190), clone HP01461 was obtained. This clone had a 5' non-translation section at 81 bp, an open reading frame at 1068 bp, a 3' non-translated section at 576 bp, and a poly (A) tail at 83 bp (Sequence No. 5). The open reading frame encodes proteins consisting of 355 amino acid residues. When a protein database was searched using this sequence, there was a high resemblance to human galectin-9 and mouse galectin-9. A comparison of the amino acid sequences in

the human galectin-9-like protein of the present invention (HS) and human galectin-9 (G9) is shown in Chart 1, and a comparison of the amino acid sequences in the human galectin-9-like protein of the present invention (HS) and the mouse galectin-9 isoform (MM) is shown in Chart 2. Here, a dash (-) indicates a cap, an asterisk (\*) indicates an amino acid sequence identical to one in the protein of the present invention, and a period (.) indicates an amino acid residue resembling one in the protein of the present invention. The comparison of the protein of the present invention to human galectin-9 indicated only six differences: the 88th lysine (arginine in G9), the insertion of a 96th glycine, the 135th serine (phenylalanine in G9), the insertion of 32 amino acid residues between the 149th and 180th places, a 270th proline (leucine in G9), and a 313th glutamic acid (glycine in G9). When the protein of the present invention was compared to the mouse galectin-9 isoform, there was a 69.3% resemblance with the protein of the present invention longer by a mere two amino acid residues. As a result, the protein of the present invention can be considered a homologue of the mouse galectin-9 isoform.

[0019]

Chart 1

(Omitted)

[0020]

Chart 2

(Omitted)

[0021]

## (2) Protein Synthesis Using In Vitro Translation

In vitro translation was performed with a T<sub>N</sub>T rabbit reticulocyte solution kit (Promega Co., Ltd.) using vector PHP01461 with the cDNA of the present invention. [<sup>35</sup>S] methionine was added at this time, and the expressed product was labeled with a radio isotope. The reaction was performed according to the accompanying protocols. Next, 100 µl of the reaction solution containing 2 µg of plasmid PHP01416, 50 µl of T<sub>N</sub>T rabbit reticulocyte solution, 4 µl of buffer solution (accompanying the kit), 2 µl of amino acid mixed solution (methionine-free), 8 µl of [<sup>35</sup>S] methionine (Amersham Co., Ltd.) (0.37 MBq/µl), 2 µl of T7RNA polymerase, and 80 U of RNasin was reacted for 90 minutes at 30°C. Then, 2 µl of SDS sampling buffer (125 mM tris-hydrochloric acid, pH 6.8, 120 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS solution, 0.025% bromophenol blue, 20% glycerol) was added to 3 µl of the reaction solution. After heat processing at 95°C for three minutes, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed. Autoradiography was then performed. Next, the molecular weight of the translated product was measured. As a result, it was determined that the cDNA of the present invention produced a translated product with an approximate molecular weight at 40 kDa (FIG 2). This value matched the molecular weights of 39 and 517 anticipated based on the base sequence expressed by Sequence No. 2. This indicates that the cDNA encodes proteins expressed by Sequence No. 2.

[0022]

### (3) Measurement of Lactose Bonding Activity in In Vitro Translation Product

After 100 ml of Sepharose 4B gel suspension (Pharmacia Corp.) was thoroughly rinsed in 0.5 M sodium carbonate, it was suspended in 100 ml of 0.5 M sodium carbonate. Then, 10 ml of vinylsulfone was added and stirred in gently for an hour at room temperature. After rinsing the gel with 0.5 M sodium carbonate, it was suspended in a 10% lactose, 0.5 M sodium carbonate solution, and stirred gently overnight at room temperature. The gel was then rinsed successively in 0.5 M sodium carbonate, water, and 0.05 M phosphoric acid buffer solution (pH 7.0). The lactose-fixed Sepharose 4B gel obtained in this manner was stored at 4°C in a 0.05 M phosphoric acid buffer solution containing 0.02% sodium azide (pH 7.0).

[0023]

Next, 100 µl of the in vitro translation reaction solution was placed in a lactose-fixed Sepharose 4B column (bed capacity 4.5 ml) prepared beforehand. After being rinsed in 20 ml of lactose column buffer solution (20 mM trishydrochloric acid buffer solution, pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 4 mM 2-mercaptoethanol, 0.01% Triton X-100), the 20 ml of buffer solution containing 0.3 M lactose was extracted. Because the eluted fractions contain 40 kDa translation product, the proteins of the present invention clearly have lactose bonding capacity (FIG 2).

[0024]

### (4) Galectin-4-Like Protein Expression and Lactose Bonding Activity in E.coli

After 1 µg of plasmid pHP01461 had been consumed by 20 units of EcoRI and 20 units of NotI, 0.8% agarose gel electrophoresis was performed, and 1.7 kbp DNA fragments were extracted. After 1 µg of E.coli expressing vector pET21a (Novagen Corp.) had been consumed by 20 units of EcoRI and 20 units of NotI, 0.8% agarose gel electrophoresis was performed, and 5.3 kbp DNA fragments were extracted. After connecting the DNA fragments using a ligation kit, E.coli JM109 was transformed. Plasmid pET-1461 was prepared from the transformant, and the target recombinant was confirmed using a restricted enzyme fraction map.

[0025]

Two oligonucleotide primers, PR1 (5'-CGCATATGGCCTTCAGCGGTTCCCAGGC-3') and PR2 (5'-AACGGCACCGTGGAGAAGGCAGGCTGAACA-3') were synthesized using a DNA automatic synthesizer (Applied Biosystems Corp.) according to the accompanying protocols. The cDNA 5' translated sections were amplified with a PCR kit (Takara Shuzo Co., Ltd.) using 1 ng plasmid pHP01461 and 100 pmole primer PR1 and primer PR2. After phenol extraction and ethanol precipitation, this was consumed by 20 units of SacI and NdeI. Next, 1.2% agarose gel electrophoresis was performed on the reaction product, 320 bp DNA fragments were broken, and the fragments were refined.

[0026]

After 1 µg of plasmid pET-1461 had been consumed by 20 units of SacI and NdeI, 0.8% agarose gel electrophoresis was performed, and 3.8 kbp DNA fragments were extracted. After the DNA fragments and 320 bp DNA fragments prepared beforehand using PCR were connected using a ligation kit, E.coli BL21 (DE3) was transformed. Plasmid pET1461 was prepared from the transformant, and the target recombinant was confirmed using a restricted enzyme fraction map.

[0027]

Next, 2 ml of pET1461/BL21 (DE3) overnight cultivation solution was suspended in a 200 ml LB culture containing 100 µg/ml ampicillin, shaken and cultivated at 37°C. When  $A_{600}$  was 0.5, 1 mM of isopropylthiogalactoside was added. After cultivation at 37°C for another three hours, the solution was centrifuged and the bacteria were suspended in 25 ml of lactose column buffering solution. After ultrasound processing was performed on the solution, the centrifuged supernatant was added to a lactose-fixed Sepharose 4B column (bed capacity 2 ml). After rinsing using 10 ml of lactose column buffering solution 10 ml, 5 ml of buffering solution containing 0.3 M lactose was extracted. When SDS-polyacrylamide electrophoresis was performed on the extracted proteins, a single band at 40 kDa was observed. The molecular weight matched the anticipated molecular weight of human galectin-9-like proteins. In other words, the human galectin-9-like proteins expressed by E.coli had lactose bonding capability.

[0028]

#### (5) Northern Blot Hybridization

In order to investigate the expression pattern in human tissue, northern blot hybridization was performed. Filters plotting poly (A) +RNA isolated from various human tissues were purchased from Clontech Corp. After plasmid pHP01049 was consumed by ApaI and BstXI, agarose gel electrophoresis was performed, and cDNA fragments were isolated. These were tagged with [ $^{32}$ P] dCTP (Amersham Corp.) using a random primer labeling kit (Takara Shuzo Co., Ltd.). In the case of the insertion section, synthetic oligonucleotide 5'-AACGGCACCGTGGAGAAGGCAGGCTGAGCA-3' was tagged with a terminal  $^{32}$ P using T4 polynucleotide kinase. Hybridization was performed using the solution accompanying the blot paper according to the protocols.

[0029]

When the cDNA was probed, the strongest expression was in the peripheral blood. Expression also occurred in the heart, placenta, lungs, spleen, thymus gland, ovaries, small intestines and large intestines. The size of the transferred products was approximately 2 k (FIG 3). When the inserted section was used as the probe, the results were different (FIG 4). The 2 k band was the strongest, indicating the small intestines and the large intestines. The lung and the peripheral blood had the weakest expression. As for the size of the other bands, there was a strong band of less than 1 k in the liver, and a 2.4 k band in the kidneys. When the inserted section was used as the probe, the expression pattern differed from the human galectin-9 expression controls different from those of human galectin-9. This means the function is probably also different.

[0030]

[Effect of the Invention]

The present invention provides human cDNA for encoding galectin-9-like proteins and proteins encoded by the human cDNA. Recombinant proteins can be expressed in large quantities using the cDNA of the present invention. These recombinant proteins can be used as medicines or as reagents in research.

[0031]

[Sequence Chart]

Sequence No: 1  
Sequence Length: 32  
Sequence Type: Amino Acid  
Topology: Straight Chain  
Sequence Category: Protein  
Hypothetical: No  
Origin:  
    Product Name: Homo Sapiens  
    Cell Category: Stomach Cancer Tissue  
    Clone Name: HP01461

Sequence

[0032]

[Sequence Chart]

Sequence No: 2  
Sequence Length: 355  
Sequence Type: Amino Acid  
Topology: Straight Chain  
Sequence Category: Protein  
Hypothetical: No  
Origin:  
    Product Name: Homo Sapiens  
    Cell Category: Stomach Cancer Tissue  
    Clone Name: HP01461

Sequence

[0033]

[Sequence Chart]

Sequence No: 3  
Sequence Length: 96  
Sequence Type: Nucleic Acid  
Number of Chains: Double Stranded  
Topology: Straight Chain

Sequence Category: cDNA to mRNA

Origin:

Product Name: Homo Sapiens  
Cell Category: Stomach Cancer Tissue  
Clone Name: HP01461

Sequence

[0034]

[Sequence Chart]

Sequence No: 4  
Sequence Length: 1065  
Sequence Type: Nucleic Acid  
Number of Chains: Double Stranded  
Topology: Straight Chain  
Sequence Category: cDNA to mRNA  
Origin:

Product Name: Homo Sapiens  
Cell Category: Stomach Cancer Tissue  
Clone Name: HP01461

Sequence

[0035]

[Sequence Chart]

Sequence No: 5  
Sequence Length: 1725  
Sequence Type: Nucleic Acid  
Number of Chains: Double Stranded  
Topology: Straight Chain  
Sequence Category: cDNA to mRNA  
Origin:

Product Name: Homo Sapiens  
Cell Category: Stomach Cancer Tissue  
Clone Name: HP01461

Sequence Characteristics:

Indicator Code: CDS  
Position: 82..1149

Sequence

[0036]

[Brief Explanation of the Drawings]

[FIG 1] A diagram indicating the structure of plasmid pHP01461.

[FIG 2] A diagram of the results from an analysis of (1) an in vitro-translated human galectin-9-like protein and (2) a lactose column-bonded human galectin-9-like protein SDS-PAGE.

[FIG 3] A diagram of the results from northern blot hybridization using a cDNA fragment as a probe.

[FIG 4] A diagram of the results from northern blot hybridization using an oligonucleotide insertion as a probe.

[Document Name] Drawings

[FIG 1]

[FIG 2]

[FIG 3]

- 1 ... Heart
- 2 ... Brain
- 3 ... Placenta
- 4 ... Lungs
- 5 ... Liver
- 6 ... Skeletal Muscle
- 7 ... Kidneys
- 8 ... Pancreas
- 9 ... Spleen
- 10 ... Thymus Gland
- 11 ... Prostate Gland
- 12 ... Testicles
- 13 ... Ovaries
- 14 ... Small Intestines
- 15 ... Large Intestines
- 16 ... Peripheral Blood White Blood Cells

[FIG 4]

- 1 ... Heart
- 2 ... Brain
- 3 ... Placenta
- 4 ... Lungs
- 5 ... Liver
- 6 ... Skeletal Muscle
- 7 ... Kidneys
- 8 ... Pancreas
- 9 ... Spleen
- 10 ... Thymus Gland
- 11 ... Prostate Gland
- 12 ... Testicles
- 13 ... Ovaries
- 14 ... Small Intestines
- 15 ... Large Intestines
- 16 ... Peripheral Blood White Blood Cells

[Document Name] Abstract

[Purpose] To provide lactose-bonding human galectin-9-like proteins expressed specifically in the gastrointestinal tract, and human cDNA encoding these proteins.

[Constitution] Human cDNA encoding galectin-9-like protein is cloned, the human cDNA is expressed by encoding E.coli proteins, and expressed product lactose bonding activity is measured.

[Selected Drawing] None

[Document Name] Authority Amendment Data  
[Amended Document] Patent Application

[Certified Data · Additional Data]

[Patent Applicant]	Petitioner
[Identification No]	000173762
[Name]	Sagami Chemical Research Institute
[Address]	4-4-1, Nishionuma, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken
[Patent Applicant]	
[Identification No]	596134998
[Name]	Protegene Co., Ltd.
[Address]	2-20-3, Nakamachi, Meguro-ku, Tokyo

## Applicant History Data

Identification Number	[000173762]								
1.	<table><tr><td>Date of Change</td><td>April 14, 1995</td></tr><tr><td>[Reason For Change]</td><td>Change of Address</td></tr><tr><td>Name</td><td>Sagami Chemical Research Institute</td></tr><tr><td>Address</td><td>4-4-1, Nishionuma, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken</td></tr></table>	Date of Change	April 14, 1995	[Reason For Change]	Change of Address	Name	Sagami Chemical Research Institute	Address	4-4-1, Nishionuma, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken
Date of Change	April 14, 1995								
[Reason For Change]	Change of Address								
Name	Sagami Chemical Research Institute								
Address	4-4-1, Nishionuma, Sagamihara-shi, Kanagawa-ken								
2.	<table><tr><td>Date of Change</td><td>February 19, 2002</td></tr><tr><td>[Reason For Change]</td><td>Change of Address</td></tr><tr><td>Name</td><td>Sagami Chemical Research Institute</td></tr><tr><td>Address</td><td>2743-1, Hayakawa, Ayase-shi, Kanagawa-ken</td></tr></table>	Date of Change	February 19, 2002	[Reason For Change]	Change of Address	Name	Sagami Chemical Research Institute	Address	2743-1, Hayakawa, Ayase-shi, Kanagawa-ken
Date of Change	February 19, 2002								
[Reason For Change]	Change of Address								
Name	Sagami Chemical Research Institute								
Address	2743-1, Hayakawa, Ayase-shi, Kanagawa-ken								

## Applicant History Data

Identification Number

[596134998]

- |    |                     |                                     |
|----|---------------------|-------------------------------------|
| 1. | Date of Change      | September 13, 1996                  |
|    | [Reason For Change] | New Registration                    |
|    | Name                | Protegene Co., Ltd.                 |
|    | Address             | 2-20-3, Nakamachi, Meguro-ku, Tokyo |

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

1997年 8月22日

出 願 番 号

Application Number:

平成 9年特許願第226468号

ST.10/C ]:

[JP1997-226468]

出 願 人

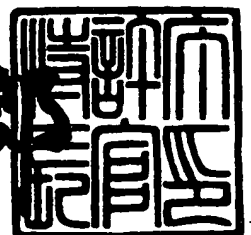
Applicant(s):

財団法人相模中央化学研究所  
株式会社プロテジーン

2002年 9月24日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一



【書類名】 特許願

【整理番号】 S018114

【提出日】 平成 9年 8月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明の名称】 ヒトガレクチン-9様蛋白質およびそれをコードする c  
DNA

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市若松 3-4-6-5-0

【氏名】 加藤 誠志

【発明者】

【住所又は居所】 東京都葛飾区高砂 5-1-3-1-1

【氏名】 山口 知子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市西大沼 4-4-1

【氏名】 関根 伸吾

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市上鶴間 5-1-7-8

【氏名】 鎌田 貢壽

【特許出願人】

【代表出願人】

【識別番号】 000173762

【郵便番号】 229

【住所又は居所】 神奈川県相模原市西大沼 4丁目4番1号

【氏名又は名称】 財団法人相模中央化学研究所

【代表者】 近藤 聖

【電話番号】 0427(42)4791

【特許出願人】

【識別番号】 596134998

【郵便番号】 153  
【住所又は居所】 東京都目黒区中町2丁目20番3号  
【氏名又は名称】 株式会社プロテジーン  
【代表者】 棚井 丈雄  
【電話番号】 03(3792)1019

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011501  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒトガレクチン-9様蛋白質およびそれをコードするcDNA

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。

【請求項2】 配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載の蛋白質。

【請求項3】 配列番号3で表される塩基配列を含むcDNA。

【請求項4】 配列番号4で表される塩基配列を含む、請求項3記載のcDNA。

【請求項5】 配列番号5で表される塩基配列からなる、請求項3あるいは請求項4記載のcDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトガレクチン-9様蛋白質、およびそれをコードしているcDNAに関する。本発明の蛋白質は、医薬や糖鎖研究のための試薬として用いることができる。本発明のヒトcDNAは、遺伝子診断用プローブや遺伝子治療用遺伝子源として用いることができる。また、該cDNAがコードしている蛋白質を大量生産するための遺伝子源として用いることができる。

【0002】

【従来の技術】

ガレクチンはガラクトースと結合する動物レクチンの総称である。動物レクチンは細胞質、核、細胞膜表面など様々な部位に存在し、細胞増殖、分化、癌化、転移、免疫などに関与していると考えられている [Drickamer, K.、Annu. Rev. Cell Biol. 9:237-264 (1993)]。これまで、ガレクチン-1からガレクチン-9まで、9種類のガレクチンが知られている。

【0003】

ガレクチン-9は、ホジキン病患者の血清に含まれている抗体と反応する抗原

蛋白質として同定されたレクチンである [Tureci, O., J. Biol. Chem. 272: 6416-6422 (1997)]。ガレクチン-9は、ガレクチン-4やガレクチン-8と同様、二つの糖鎖結合ドメインが、リンカーペプチドによって連結した構造をとっている。その生体内での本当の役割はまだ完全には解明されていないが、細胞間の接着に関与していると考えられている。マウスでは、分子量が異なる二種類のガレクチン-9が報告されているが [Wada, J. and Kanwar, Y. S., J. Biol. Chem. 272: 6078-6086 (1997)]、ヒトでは、まだそのようなアイソフォームの報告はない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ヒトガレクチン-9様蛋白質、およびこれをコードするcDNAを提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、ガレクチン-9様蛋白質をコードするヒトcDNAをクローン化し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、ガレクチン-9様蛋白質である、配列番号1あるいは配列番号2で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質を提供する。また本発明は上記蛋白質をコードする、配列番号3から配列番号5で表される塩基配列を含むcDNAを提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明の蛋白質は、ヒトの臓器、細胞株などから単離する方法、本発明のアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいは本発明のヒトガレクチン-9様蛋白質をコードするDNAを用いて組換えDNA技術で生産する方法などにより取得することができるが、組換えDNA技術で取得する方法が好ましく用いられる。例えば、本発明のcDNAを有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現出来る。また翻訳領域を公知の方法により適当な発

現ベクターに組換えてやれば、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、コードしている蛋白質を大量に発現させることができる。

【0007】

本発明の蛋白質を、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、cDNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、本発明のcDNAの翻訳領域を組換えた発現ベクターを作成し、該発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体を培養してやれば、該cDNAがコードしている蛋白質を微生物内で大量生産することができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。該融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによって該cDNAがコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。本発明の蛋白質の範囲には、ラクトース結合活性を有するものであれば、該融合蛋白質も含まれる。

【0008】

本発明の蛋白質を、動物細胞で分泌発現させる場合には、該cDNAの翻訳領域を、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する動物細胞用発現ベクターに組換え、動物細胞内に導入してやれば、本発明の蛋白質を細胞外に分泌生産することができる。

【0009】

本発明の蛋白質には、配列番号1で表されるアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列を含むペプチド断片(5アミノ酸残基以上)も含まれる。これらのペプチド断片は抗体を作製するための抗原として用いることができる。また、本発明の蛋白質は、細胞外に分泌される。アミノ酸配列の中に糖鎖結合可能な部位が存在するので、適当な動物細胞で発現させれば糖鎖が付加した蛋白質が得られる。したがって、このような糖鎖が付加した蛋白質あるいはペプチドも本発明の蛋白質の範疇にはいる。

【0010】

本発明のDNAには、上記蛋白質をコードするすべてのDNAが含まれる。該DNAは、化学合成による方法、cDNAクローニングによる方法などを用いて

取得することができる。

【0011】

本発明のヒトcDNAは、ヒト細胞由来cDNAライブラリーからクローン化することが出来る。このcDNAライブラリーはヒト細胞から抽出したポリ(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型として作製する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。実施例では胃癌組織から単離したポリ(A)<sup>+</sup>RNAを用いた。cDNAの合成にあたっては、岡山-Berg法[Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol. 2:161-170 (1982)]、Gubler-Hoffman法[Gubler, U. and Hoffman, J. Gene 25:263-269 (1983)]などいかなる方法を用いてもよいが、完全長クローンを効率的に得るためには、キャッピング法[Kato, S. et al., Gene 150:243-250 (1994)]を用いることが望ましい。cDNAの同定は、シーケンシングによる全塩基配列の決定、塩基配列から予測されるアミノ酸配列と類似配列を有する既知蛋白質の検索、インビトロ翻訳による蛋白質発現、大腸菌による発現、発現産物の活性測定によって行なう。活性測定は、ラクトースとの結合能を確認することによって行なう。

【0012】

本発明のcDNAは、配列番号3あるいは配列番号4で表される塩基配列を含むことを特徴とするものであり、例えば、配列番号5で表されるものは、1725bpからなる塩基配列を有し、1068bpのオープンリーディングフレームを有している。このオープンリーディングフレームは、355アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしている。この蛋白質はアミノ酸配列レベルでマウスガレクチン-9アイソフォームと69.3%という高い類似性を有している。

【0013】

なお、配列番号3に記載のcDNAの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ヒト細胞から作製したヒトcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のcDNAと同一のクローンを容易に得ることが出来る。

【0014】

一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号3から配列番号5において、1又は複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／又は他のヌクレオチドによる置換がなされているcDNAも本発明の範疇にはいる。

【0015】

同様に、これらの変更によって生じる、1又は複数個のアミノ酸の付加、欠失および／又は他のアミノ酸による置換がなされている蛋白質も、ヒトガレクチン-9様活性を有する限り、本発明の範疇に入る。

【0016】

本発明のcDNAには、配列番号3で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含むcDNA断片(10bp以上)も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなるDNA断片もこの範疇にはいる。これらのDNA断片は遺伝子診断用のプローブとして用いることができる。

【0017】

【実施例】

次に実施例により発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。DNAの組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献["Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989]に従った。制限酵素および各種修飾酵素は、特に記載の無い場合、宝酒造社製のものを用了。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。

【0018】

(1) cDNAクローニング

ヒト胃癌細胞cDNAライブラリー(WO97/03190記載)から選択したcDNAクローンの大規模塩基配列決定の結果、クローンHP01461を得た。本クローンは、81bpの5'非翻訳領域、1068bpのオープンリーディングフレーム、576bpの3'非翻訳領域、83bpのポリ(A)テールか

らなる構造を有していた（配列番号5）。オープンリーディングフレームは355アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、この配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、ヒトガレクチン-9ならびにマウスガレクチン-9アイソフォームのアミノ酸配列と高い類似性を有していた。表1に、本発明のヒトガレクチン様蛋白質（HS）とヒトガレクチン-9（G9）のアミノ酸配列の比較を、表2に、本発明のヒトガレクチン様蛋白質（HS）とマウスガレクチン-9アイソフォーム（MM）のアミノ酸配列の比較を示す。－はギャップを、＊は本発明の蛋白質と同一アミノ酸残基を、. は本発明の蛋白質と類似アミノ酸残基をそれぞれ表す。本発明の蛋白質をヒトガレクチン-9と比較すると、次の6箇所に違いが認められた。すなわち、88番目のリジン（G9ではアルギニン）、96番目のグリシンの挿入、135番目のセリン（G9ではフェニルアラニン）、149番目から180番目までの32アミノ酸残基の挿入、270番目のプロリン（G9ではロイシン）、313番目のグルタミン酸（G9ではグリシン）である。本発明の蛋白質をマウスガレクチン-9アイソフォームと比較した場合、本発明の蛋白質の方が2アミノ酸残基長いだけで、全領域にわたって69.3%という類似性を示すことから、本発明の蛋白質は、マウスガレクチン-9アイソフォームの相同体と思われる。

【0019】

表1

---

```

HS  MAFSGSQAPYLSPAVPFSGTIQGGLQDGLQITVNGTVLSSSGTRFAVNFQTGFSGNDIAF
*****
G9  MAFSGSQAPYLSPAVPFSGTIQGGLQDGLQITVNGTVLSSSGTRFAVNFQTGFSGNDIAF
HS  HFNPRFEDGGYVVCNTRQNGSWGPEERKTHMPFQKGMFDLCFLVQSSDFKVMVNGILFV
*****
G9  HFNPRFEDGGYVVCNTRQNGSWGPEERRTHMPFQK-MPFDLCFLVQSSDFKVMVNGILFV
HS  QYFHRVPFHRVDTISVNGSVQLSYISFQNPRTVPVQPAFSTVPFSQPVCPPRPRGRRQK
*****
G9  QYFHRVPFHRVDTIFVNGSVQLSYISFQ-----

```

HS PPGVWPANPAPITQTVIHTVQSAPGQMFSTPAIPPMYPHPAYPMPFITTILGGLYPSKS  
 \*\*\*\*\*  
 G9 PPGVWPANPAPITQTVIHTVQSAPGQMFSTPAIPPMYPHPAYPMPFITTILGGLYPSKS  
 HS ILLSGTVLPSAQRFHINLCSGNHIAFHLNPRFDENAVVRNTQIDNSWGSEERSLPRKMPF  
 \*\*\*\*\*  
 G9 ILLSGTVLPSAQRFHINLCSGNHIAFHLNLRFDENAVVRNTQIDNSWGSEERSLPRKMPF  
 HS VRGQSFSVWILCEAHCLKVAVDGQHLFEYYHRLRNLPTINRLEVGGDIQLTHVQT  
 \*\*\*\*\*  
 G9 VRGQSFSVWILCEAHCLKVAVDGQHLFEYYHRLRNLPTINRLEVGGDIQLTHVQT

【0020】

表 2

HS MAFSGSQAPYLSPAVPFSGTIQGGLQDGLQITVNGTVLSSSGTRFAVNFQTGFSGNDIAF  
 \*\*. .\*.\*\*.\*. \*\*.\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*.\*\*\*. .\*. \*\*.\*\*\*\*\*.\*.\*\*\*\*\*  
 MM MALFSAQSPYINPIIPFTGPIQGGLQEGLQVTLQGT-KSFAQRFVVNFQNSFNNDIAF  
 HS HFNPRFEDGGYVVCNTRQNGSWGPEERKTHMPFQKGMPFDLCFLVQSSDFKVMVNGILFV  
 \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\* \*\*\*\*\* .\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*.\*\*\*\*\* \*\*.\*\*\*  
 MM HFNPRFEEGGYVVCNTKQNGQWGPEERKMMPFQKGMPFELCFLVQRSEFKVMVNKKFFV  
 HS QYFHRVPFHRVDTISVNGSVQLSYISFQNPRTPVPQAFSTVPFSQPVCPPRPRGRRQK  
 \*\* \*\*\*\*.\* \*\*\*\*.\*.\*\*\*.\*\*\*. .\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*. \*.\*\*.\*  
 MM QYQHRVPYHLVDTIIVSGCLKLSFITFQNS-AAPVQHVFSTLQFSQPVPFPRTPKGRKQK  
 HS PPGVWPANPAPITQTVIHTVQSAPGQMFSTPAIPPMYPHPAYPMPFITTILGGLYPSKS  
 ....\*\*.\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*.\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*.\*\*\*.\*\*\*\*\*  
 MM TQNFRPAHQAPMAQTTIHMVHSTPGQMFSTPGIPPVVYPTPAYTIPFYTPINGLYPSKS  
 HS ILLSGTVLPSAQRFHINLCSGNHIAFHLNPRFDENAVVRNTQIDNSWGSEERSLPRKMPF  
 \*.\*\*.\*.\*\*\*.\* \*\*\*\*\* .\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* .\*\*\*  
 MM IMISGNVLPDATTRFHINLRCGGDIAFHLNPRFNENAVVRNTQINNSWGQEERSLLGRMPF  
 HS VRGQSFSVWILCEAHCLKVAVDGQHLFEYYHRLRNLPTINRLEVGGDIQLTHVQT

\*\*\*\*\*. \*\*. \*\*. \*\*\*\*. \*\*\*\*. \*\*\*\*\*. \*\*. \*\*. \*\*\*\*. \*\*\*\*\*

MM SRGQSFSVWIIICEGHCFKVAVNGQHMCEYYHRLKNLQDINTLEVAGDIQLTHVQT

## 【0021】

## (2) インビトロ翻訳による蛋白質合成

本発明のcDNAを有するベクターpHP01461を用いて、T<sub>N</sub>Tウサギ網状赤血球溶解物キット（プロメガ社製）によるインビトロ翻訳を行なった。この際 [<sup>35</sup>S] メチオニンを添加し、発現産物をラジオアイソトープでラベルした。いずれの反応もキットに付属のプロトコールに従って行なった。プラスミドpHP01416 2 μgを、T<sub>N</sub>Tウサギ網状赤血球溶解物50 μl、緩衝液（キットに付属）4 μl、アミノ酸混合液（メチオニンを含まない）2 μl、 [<sup>35</sup>S] メチオニン（アマーシャム社）8 μl（0.37 MBq/μl）、T7 RNAポリメラーゼ2 μl、RNasin 80 Uを含む総量100 μlの反応液中で30℃で90分間反応させた。反応液3 μlにSDSサンプリングバッファー（125 mMトリス塩酸緩衝液、pH 6.8、120 mM2-メルカプトエタノール、2% SDS溶液、0.025% ブロモフェノールブルー、20% グリセロール）2 μlを加え、95℃3分間加熱処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。オートラジオグラフィーを行ない、翻訳産物の分子量を求めた結果、本発明のcDNAは、分子量約40 kDaの翻訳産物を生成した（図2）。この値は、配列番号2で表される塩基配列から予想される蛋白質の予想分子量39,517と一致し、このcDNAが確かに配列番号2で表される蛋白質をコードしていることが示された。

## 【0022】

## (3) インビトロ翻訳産物のラクトース結合活性測定

セファロース4Bゲル懸濁液（ファルマシア社）100 mlを0.5 M炭酸ナトリウムで十分洗浄した後、100 mlの0.5 M炭酸ナトリウムに懸濁した。これにビニルスルホン10 mlを添加し、室温で1時間緩やかに攪拌した。ゲルを0.5 M炭酸ナトリウムで洗浄した後、10% ラクトース、0.5 M炭酸ナトリウム溶液に懸濁し室温で一晩緩やかに攪拌した。ゲルを0.5 M炭酸ナトリウ

ム、水、0.05Mリン酸緩衝液（pH7.0）で順次洗浄した。得られたラクトース固定化セファロース4Bゲルは、0.02%アジ化ナトリウムを含む0.05Mリン酸緩衝液（pH7.0）中、4℃で保存した。

【0023】

インビトロ翻訳反応液100 $\mu$ lを先に調製したラクトース固定化セファロース4Bカラム（ベッド容積4.5ml）にかけ、ラクトースカラム用カラム緩衝液（20mMトリス塩酸緩衝液、pH7.5、2mM EDTA、150mM NaCl、4mM2-メルカプトエタノール、0.01%Triton X-100）20mlで洗浄後、0.3Mラクトースを含むカラム緩衝液20mlで溶出した。その結果、溶出画分に40kDaの翻訳産物が含まれていることから、本発明の蛋白質はラクトース結合能を有することが示された（図2）。

【0024】

（4）大腸菌によるガレクチン-4様蛋白質の発現とラクトース結合活性

プラスミドpHP01461 1 $\mu$ gを、20単位のEcoRIと20単位のNotIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約1.7kbpのDNA断片をゲルから切り出した。ついで、大腸菌用発現ベクターpET21a（Novagen社製）1 $\mu$ gを20単位のEcoRIと20単位のNotIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約5.3kbpのDNA断片をゲルから切り出した。両者のDNA断片をライゲーションキットにより連結後、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpET-1461を調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。

【0025】

2本のオリゴヌクレオチドプライマーPR1（5'-CGCATATGGCC TTCAGCGGTTCCCAGGC-3'）とPR2（5'-AACGGCA CCGTGGAGAAGGCAGGCTGAACA-3'）をDNA自動合成機（アプライドバイオシステムズ社）により付属のプロトコールに従い合成した。プラスミドpHP01461を1ngとプライマーPR1、PR2それぞれ100pmoleを用いて、PCRキット（宝酒造社）によりcDNAの5'側翻訳領域を増幅した。フェノール抽出、エタノール沈殿後、20単位のSacIとN

d e I で消化し、反応産物を 1. 2 % アガロースゲル電気泳動にかけ、約 3 2 0 b p の DNA 断片をゲルから切り出し精製した。

【0026】

プラスミド p E T - 1 4 6 1 1  $\mu$  g を、20 単位の S a c I と N d e I で消化した後、0. 8 % アガロースゲル電気泳動にかけ、3. 8 k b p の DNA 断片をゲルから切り出した。この DNA 断片と先に P C R によって調製した約 3 2 0 b p の DNA 断片を、ライゲーションキットにより連結後、大腸菌 B L 2 1 ( D E 3 ) を形質転換した。形質転換体からプラスミド p E T 1 4 6 1 を調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。

【0027】

p E T 1 4 6 1 / B L 2 1 ( D E 3 ) の一晚培養液 2 m l を 1 0 0  $\mu$  g / m l アンピシリン含有 L B 培地 2 0 0 m l に懸濁し、37℃で振とう培養し、A<sub>600</sub> が約 0. 5 になったときにイソプロピルチオガラクトシドを 1 m M になるように添加した。さらに 37℃で 3 時間培養後、遠心によって集菌し、菌体をラクトースカラム用カラム緩衝液 2 5 m l に懸濁した。この溶液を超音波処理後、遠心し、上澄を先に調製したラクトース固定化セファロース 4 B カラム ( ベッド容積 2 m l ) にかけ、ラクトースカラム用カラム緩衝液 1 0 m l で洗浄後、0. 3 M ラクトースを含むカラム緩衝液 5 m l で溶出した。溶出してきた蛋白質を S D S - ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、4 0 k D a の位置に単一のバンドが認められた。この分子量の値は、ヒトガレクチン- 9 様蛋白質の予想分子量と一致する。すなわち、大腸菌で発現させたヒトガレクチン- 9 様蛋白質はラクトース結合活性を有することが示された。

【0028】

(5) ノザンブロットハイブリダイゼーション

ヒト組織における発現パターンを調べるため、ノザンブロットハイブリダイゼーションを行った。ヒトの各組織から単離したポリ ( A ) <sup>+</sup> R N A をブロットしたフィルターをクローンテック社から購入した。プラスミド p H P 0 1 0 4 9 を A p a L I と B s t X I で消化した後、アガロースゲル電気泳動にかけて c D N A 断片を単離したのち、ランダムプライマーラベリングキット ( 宝酒造社 ) によ

り、 $[^{32}\text{P}]$  dCTP (アマーシャム社) で標識した。また、挿入部分については、合成オリゴヌクレオチド 5' - AACGGCACCGTGGAGAAGGCAGGCTGAGCA - 3' を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼで末端 $^{32}\text{P}$  標識を行った。ハイブリダイゼーションは、プロットペーパーに付属の溶液を用いプロトコールに従って行った。

【0029】

cDNA断片をプローブとした場合、末梢血で最も強い発現が認められ、他に心臓、胎盤、肺、脾臓、胸腺、卵巣、小腸、大腸で発現が認められた。いずれも転写産物の大きさは、約2 kであった(図3)。一方、挿入部分をプローブとして用いた場合には、これとは異なった結果を示した(図4)。約2 kのバンドが、最も強いのは、小腸と大腸であり、他に肺、末梢血で弱い発現が認められた。この大きさのバンド以外に、肝臓で1 k以下の強いバンドが、また腎臓で約2.4 kのバンドが見られた。このように、挿入部分をプローブとして用いた場合、ヒトガレクチン-9の発現パターンと異なることから、本発明の蛋白質は、既知のヒトガレクチン-9とは異なる発現制御を受けていることが示され、その機能も異なることが予想される。

【0030】

【発明の効果】

本発明はガレクチン-9様蛋白質をコードするヒトcDNA、このヒトcDNAがコードする蛋白質を提供する。本発明のcDNAを用いることにより、該組換え蛋白質を大量に発現することができる。該組換え蛋白質は、医薬・研究用試薬として利用することができる。

【0031】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：32

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

ハイボセティカル：No

起源：

生物名：ホモ＝サピエンス

細胞の種類：胃癌組織

クローン名：HP01461

配列

Asn Pro Arg Thr Val Pro Val Gln Pro Ala Phe Ser Thr Val Pro Phe

1

5

10

15

Ser Gln Pro Val Cys Phe Pro Pro Arg Pro Arg Gly Arg Arg Gln Lys

20

25

30

【0032】

配列番号：2

配列の長さ：355

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

ハイボセティカル：No

起源：

生物名：ホモ＝サピエンス

細胞の種類：胃癌組織

クローン名：HP01461

配列

Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr Leu Ser Pro Ala Val Pro

1

5

10

15

Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln Asp Gly Leu Gln Ile Thr

20

25

30

Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly Thr Arg Phe Ala Val Asn

35

40

45

Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile Ala Phe His Phe Asn Pro

50	55	60
Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys Asn Thr Arg Gln Asn Gly		
65	70	75
Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His Met Pro Phe Gln Lys Gly		
	85	90
Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln Ser Ser Asp Phe Lys Val		
100	105	110
Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr Phe His Arg Val Pro Phe		
115	120	125
His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly Ser Val Gln Leu Ser Tyr		
130	135	140
Ile Ser Phe Gln Asn Pro Arg Thr Val Pro Val Gln Pro Ala Phe Ser		
145	150	155
Thr Val Pro Phe Ser Gln Pro Val Cys Phe Pro Pro Arg Pro Arg Gly		
	165	170
Arg Arg Gln Lys Pro Pro Gly Val Trp Pro Ala Asn Pro Ala Pro Ile		
180	185	190
Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser Ala Pro Gly Gln Met Phe		
195	200	205
Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr Pro His Pro Ala Tyr Pro		
210	215	220
Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly Leu Tyr Pro Ser Lys Ser		
225	230	235
Ile Leu Leu Ser Gly Thr Val Leu Pro Ser Ala Gln Arg Phe His Ile		
	245	250
Asn Leu Cys Ser Gly Asn His Ile Ala Phe His Leu Asn Pro Arg Phe		
260	265	270
Asp Glu Asn Ala Val Val Arg Asn Thr Gln Ile Asp Asn Ser Trp Gly		
275	280	285

Ser Glu Glu Arg Ser Leu Pro Arg Lys Met Pro Phe Val Arg Gly Gln

290

295

300

Ser Phe Ser Val Trp Ile Leu Cys Glu Ala His Cys Leu Lys Val Ala

305

310

315

320

Val Asp Gly Gln His Leu Phe Glu Tyr Tyr His Arg Leu Arg Asn Leu

325

330

335

Pro Thr Ile Asn Arg Leu Glu Val Gly Gly Asp Ile Gln Leu Thr His

340

345

350

Val Gln Thr

355

【0033】

配列番号：3

配列の長さ：96

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ホモ=サピエンス

細胞の種類：胃癌組織

クローン名：HP01461

配列

AACCCCGCA CAGTCCCTGT TCAGCCTGCC TTCTCCACGG TGCCGTTCTC CCAGCCTGTC 60

TGTTTCCCAC CCAGGCCAG GGGGCGCAGA CAAAAA 96

【0034】

配列番号：4

配列の長さ：1065

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ホモ=サピエンス

細胞の種類：胃癌組織

クローン名：HP01461

配列

ATGGCCTTCA GCGGTTCCTA GGCTCCCTAC CTGAGTCCAG CTGTCCCCTT TTCTGGGACT	60
ATTCAAGGAG GTCTCCAGGA CGGACTTCAG ATCACTGTCA ATGGGACCGT TCTCAGCTCC	120
AGTGGAAACA GGTTCGCTGT GAACTTTCAG ACTGGCTTCA GTGGAAATGA CATTGCCTTC	180
CACTTCAACC CTCGGTTTGA AGATGGAGGG TACGTGGTGT GCAACACGAG GCAGAACGGA	240
AGCTGGGGGC CCGAGGAGAG GAAGACACAC ATGCCTTTCC AGAAGGGGAT GCCCTTTGAC	300
CTCTGCTTCC TGGTGCAGAG CTCAGATTTC AAGGTGATGG TGAACGGGAT CCTCTTCGTG	360
CAGTACTTCC ACCGCGTGCC CTTCCACCGT GTGGACACCA TCTCCGTCAA TGGCTCTGTG	420
CAGCTGTCCT ACATCAGCTT CCAGAACCCC CGCACAGTCC CTGTTCAGCC TGCCTTCTCC	480
ACGGTGCCGT TCTCCCAGCC TGTCTGTTTC CCACCCAGGC CCAGGGGGCG CAGACAAAAA	540
CCTCCCGGCG TGTGGCCTGC CAACCCGGCT CCCATTACCC AGACAGTCAT CCACACAGTG	600
CAGAGCGCCC CTGGACAGAT GTTCTCTACT CCCGCCATCC CACCTATGAT GTACCCCCAC	660
CCCGCCTATC CGATGCCTTT CATCACCACC ATTCTGGGAG GGCTGTACCC ATCCAAGTCC	720
ATCCTCCTGT CAGGCACTGT CCTGCCCAGT GCTCAGAGGT TCCACATCAA CCTGTGCTCT	780
GGGAACCACA TCGCCTTCCA CCTGAACCCC CGTTTTGATG AGAATGCTGT GGTCCGCAAC	840
ACCCAGATCG ACAACTCCTG GGGGTCTGAG GAGCGAAGTC TGCCCCGAAA AATGCCCTTC	900
GTCCGTGGCC AGAGCTTCTC AGTGTGGATC TTGTGTGAAG CTCACTGCCT CAAGGTGGCC	960
GTGGATGGTC AGCACCTGTT TGAATACTAC CATCGCCTGA GGAACCTGCC CACCATCAAC	1020
AGACTGGAAG TGGGGGGCGA CATCCAGCTG ACCCATGTGC AGACA	1065

【0035】

配列番号：5

配列の長さ：1725

配列の型：核酸

鎖の数： 二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：ホモ=サピエンス

細胞の種類：胃癌組織

クローン名：HP01461

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：82..1149

配列

TTTCTTTGTT AAGTCGTTCC CTCTACAAAG GACTTCCTAG TGGGTGTGAA AGGCAGCGGT	60
GGCCACAGAG GCGGCGGAGA G ATG GCC TTC AGC GGT TCC CAG GCT CCC TAC	111
Met Ala Phe Ser Gly Ser Gln Ala Pro Tyr	
1 5 10	
CTG AGT CCA GCT GTC CCC TTT TCT GGG ACT ATT CAA GGA GGT CTC CAG	159
Leu Ser Pro Ala Val Pro Phe Ser Gly Thr Ile Gln Gly Gly Leu Gln	
15 20 25	
GAC GGA CTT CAG ATC ACT GTC AAT GGG ACC GTT CTC AGC TCC AGT GGA	207
Asp Gly Leu Gln Ile Thr Val Asn Gly Thr Val Leu Ser Ser Ser Gly	
30 35 40	
ACC AGG TTT GCT GTG AAC TTT CAG ACT GGC TTC AGT GGA AAT GAC ATT	255
Thr Arg Phe Ala Val Asn Phe Gln Thr Gly Phe Ser Gly Asn Asp Ile	
45 50 55	
GCC TTC CAC TTC AAC CCT CGG TTT GAA GAT GGA GGG TAC GTG GTG TGC	303
Ala Phe His Phe Asn Pro Arg Phe Glu Asp Gly Gly Tyr Val Val Cys	
60 65 70	
AAC ACG AGG CAG AAC GGA AGC TGG GGG CCC GAG GAG AGG AAG ACA CAC	351
Asn Thr Arg Gln Asn Gly Ser Trp Gly Pro Glu Glu Arg Lys Thr His	

75	80	85	90	
ATG CCT TTC CAG AAG GGG ATG CCC TTT GAC CTC TGC TTC CTG GTG CAG				399
Met Pro Phe Gln Lys Gly Met Pro Phe Asp Leu Cys Phe Leu Val Gln				
	95	100	105	
AGC TCA GAT TTC AAG GTG ATG GTG AAC GGG ATC CTC TTC GTG CAG TAC				447
Ser Ser Asp Phe Lys Val Met Val Asn Gly Ile Leu Phe Val Gln Tyr				
	110	115	120	
TTC CAC CGC GTG CCC TTC CAC CGT GTG GAC ACC ATC TCC GTC AAT GGC				495
Phe His Arg Val Pro Phe His Arg Val Asp Thr Ile Ser Val Asn Gly				
	125	130	135	
TCT GTG CAG CTG TCC TAC ATC AGC TTC CAG AAC CCC CGC ACA GTC CCT				543
Ser Val Gln Leu Ser Tyr Ile Ser Phe Gln Asn Pro Arg Thr Val Pro				
	140	145	150	
GTT CAG CCT GCC TTC TCC ACG GTG CCG TTC TCC CAG CCT GTC TGT TTC				591
Val Gln Pro Ala Phe Ser Thr Val Pro Phe Ser Gln Pro Val Cys Phe				
	155	160	165	170
CCA CCC AGG CCC AGG GGG CGC AGA CAA AAA CCT CCC GGC GTG TGG CCT				639
Pro Pro Arg Pro Arg Gly Arg Arg Gln Lys Pro Pro Gly Val Trp Pro				
	175	180	185	
GCC AAC CCG GCT CCC ATT ACC CAG ACA GTC ATC CAC ACA GTG CAG AGC				687
Ala Asn Pro Ala Pro Ile Thr Gln Thr Val Ile His Thr Val Gln Ser				
	190	195	200	
GCC CCT GGA CAG ATG TTC TCT ACT CCC GCC ATC CCA CCT ATG ATG TAC				735
Ala Pro Gly Gln Met Phe Ser Thr Pro Ala Ile Pro Pro Met Met Tyr				
	205	210	215	
CCC CAC CCC GCC TAT CCG ATG CCT TTC ATC ACC ACC ATT CTG GGA GGG				783
Pro His Pro Ala Tyr Pro Met Pro Phe Ile Thr Thr Ile Leu Gly Gly				
	220	225	230	
CTG TAC CCA TCC AAG TCC ATC CTC CTG TCA GGC ACT GTC CTG CCC AGT				831

18

CTCCTCAGCC CCTCCTCTCT GACCTTTAAC CTCACTCTCA CCTTGCACCG TGCACCAACC 1590  
 CTTCACCCCT CCTGGAAAGC AGGCCTGATG GCTTCCCACT GGCCTCCACC ACCTGACCAG 1650  
 AGTGTTCCTCT TCAGAGGACT GGCTCCTTTC CCAGTGTCTT TAAAATAAAG AAATGAAAAT 1710  
 GCTTGTTGGC ACATT 1725

【0036】

【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミド pHP01461 の構造を表す図である。

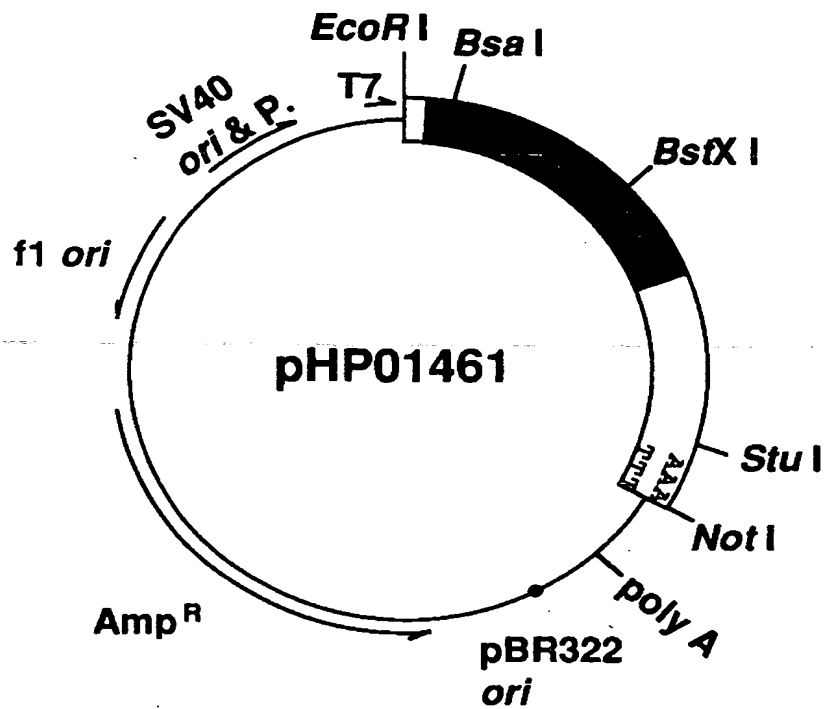
【図2】 (1) インビトロ翻訳したヒトガレクチン-9 様蛋白質並びに (2) ラクトースカラムに結合したヒトガレクチン-9 様蛋白質の SDS-PAGE による解析結果を示す図である。

【図3】 cDNA 断片をプローブとして用いて、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った結果を示す図である。

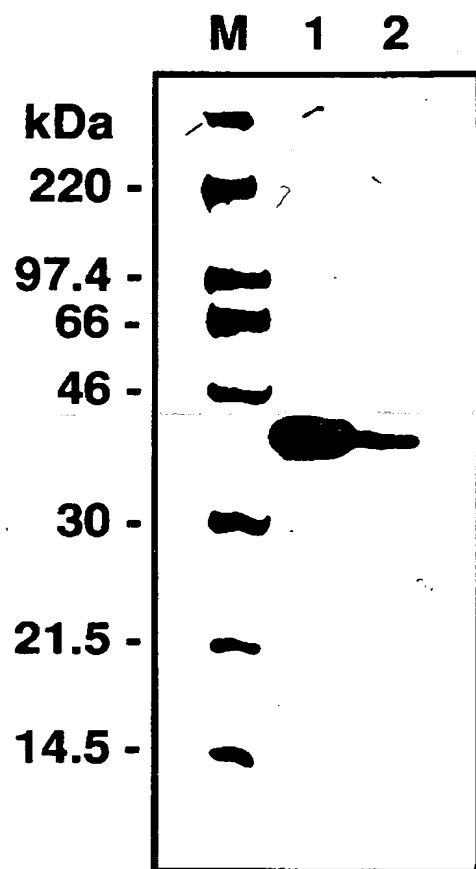
【図4】 挿入部分のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、ノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った結果を示す図である。

【書類名】 図面

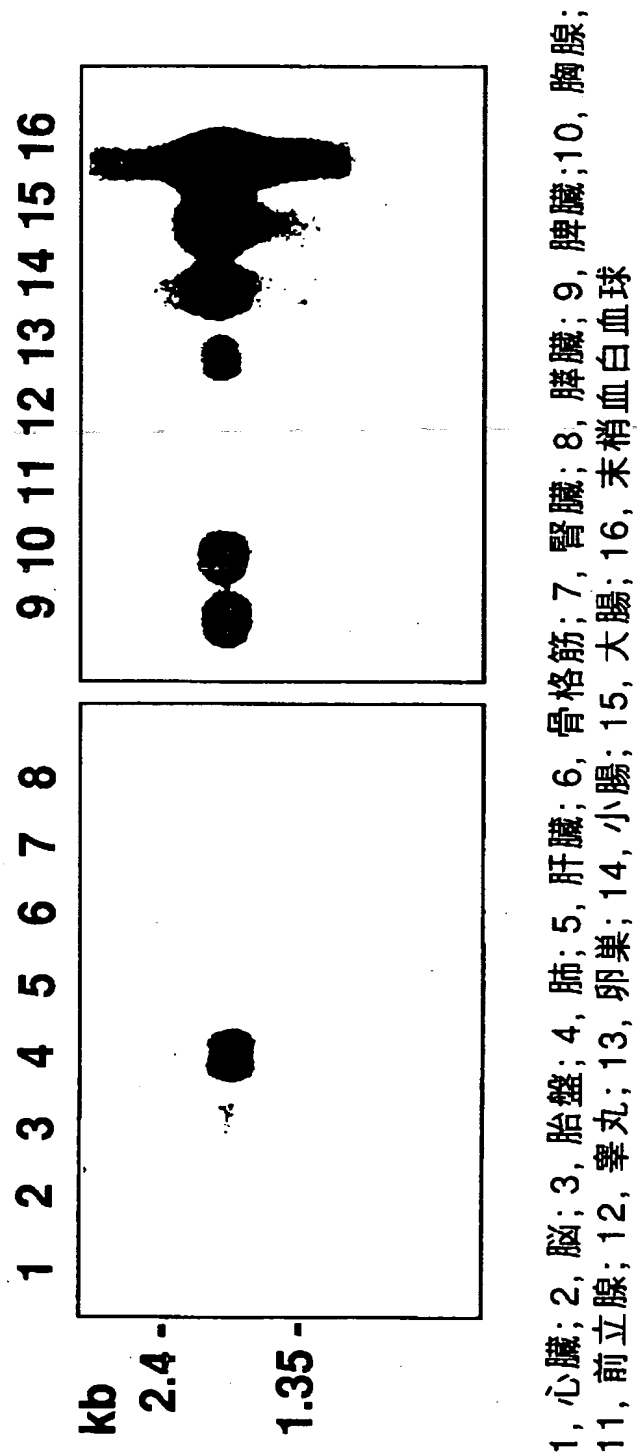
【図1】



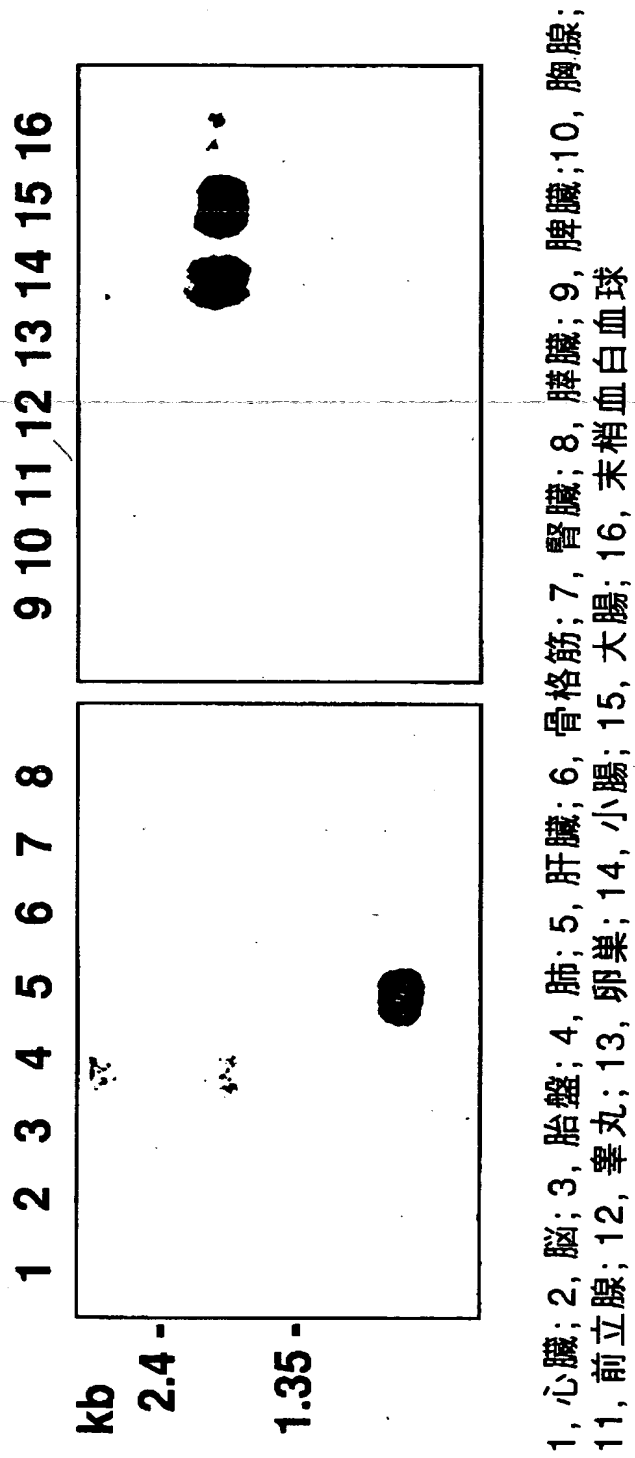
【図2】



【图3】



【図4】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 胃腸に特異的に発現しているラクトース結合蛋白質ガレクチン-9様蛋白質およびそれをコードするヒトcDNAを提供する。

【構成】 ガレクチン-9様蛋白質をコードするヒトcDNAのクローニング、このヒトcDNAがコードする蛋白質の大腸菌による発現、および発現産物のラクトース結合活性測定からなる。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000173762

【住所又は居所】

神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号

【氏名又は名称】

財団法人相模中央化学研究所

【特許出願人】

【識別番号】

596134998

【住所又は居所】

東京都目黒区中町2丁目20番3号

【氏名又は名称】

株式会社プロテジーン

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173762]

1. 変更年月日 1995年 4月14日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号  
氏 名 財団法人相模中央化学研究所
2. 変更年月日 2002年 2月19日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 神奈川県綾瀬市早川2743番地1  
氏 名 財団法人相模中央化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596134998]

1. 変更年月日 1996年 9月13日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都目黒区中町2丁目20番3号

氏 名 株式会社プロテジーン